

7/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008469147

WPI Acc No: 1990-356147/199048

Dihomo-gamma-linolenic acid prodn. - by cultivating microorganism with ability to produce cpd. n culture medium contg. specified alkoxy aromatic cpd.

Patent Assignee: IDEMITSU PETROCHEM CO (IDEM)

Inventor: NAKAJIMA T; SHIMAUCHI T

Number of Countries: 011 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 399494	A	19901128	EP 90109800	A	19900523	199048 B
JP 3049688	A	19910304	JP 89183789	A	19890718	199115

JP 3072892	A	19910328	JP 90131357	A	19900523	199119
US 5093249	A	19920303	US 90524647	A	19900516	199212
JP 2740854	B2	19980415	JP 89183789	A	19890718	199820
JP 2958361	B2	19991006	JP 90131357	A	19900523	199947

Priority Applications (No Type Date): JP 89183789 A 19890718; JP 89128916 A 19890524; JP 90131357 A 19900523

Cited Patents: Jnl.Ref; EP 155420; EP 252716; EP 304049

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 399494	A	13		

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE

US 5093249	A	6		
JP 2740854	B2	4	C12P-007/40	Previous Publ. patent JP 3049688
JP 2958361	B2	6	C12P-007/64	Previous Publ. patent JP 3072892

Abstract (Basic): EP 399494 A

Producing dihomogamma-linolenic acid comprises cultivating a microorganism having an ability to produce dihomogamma-linolenic acid on a culture medium contg. a cpd. of formula (I) or curcumene, and then recovering dihomogamma-linolenic acid from the cultivated prod. R1 = lower alkyl; R2 = OH, alkyl, alkoxy, alkenyl or oxyalkyl; n = 0-5. Also claimed is an inhibitor for unsaturation at 4-5 position of fatty acids contg. cpd. (I).

USE/ADVANTAGE - Cpd. (I) or curcumene is added to the culture medium in an amt. of 0.01-10 g/l of the culture medium. Cpd. (I) or curcumene has an ability to inhibit an unsaturation reaction at a delta-5 position of fatty acids.

Abstract (Equivalent): US 5093249 A

Prepn. of dihomogamma-linolenic acid (I) comprises cultivating *Conidiobolus nanodes* GBS 183/62 or *Conidiobolus Lamprauges* (ATCC 12585) on a culture medium contg. a cpd. (II) chosen from diethoxybenzene, methoxyphenol, t-butylhydroxy anisole and eugenol and recovering (I).

Pref. the culture medium contains 0.01-10, esp. 0.05-2 g/l of (II). Pref. cultivation is carried out at 10-40 deg. C for 1-20 days.

ADVANTAGE - (II) inhibits unsaturation reaction at the delta 5 position.

(6pp)

Derwent Class: B05; D16; E17

International Patent Class (Main): C12P-007/40; C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C12P-007/62; C12R-001/64;

C12P-007/40; C12R-001-645; C12P-007/64

?map anpryy temp s7

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平3-72892

⑫ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)3月28日

C 12 P 7/40
 (C 12 P 7/40
 C 12 R 1:645)

6742-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 ジホモマーリノレン酸の製造法および脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤

⑮ 特 願 平2-131357

⑯ 出 願 平2(1990)5月23日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)5月24日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 平1-128916

⑳ 発 明 者 中 島 寿 昭 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1680番地 出光石油化学株式会社内

㉑ 発 明 者 島 内 敏 次 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

㉒ 出 願 人 出光石油化学株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

㉓ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

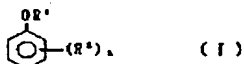
明 細 書

1. 発明の名称

ジホモマーリノレン酸の製造法および脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤

2. 特許請求の範囲

(1) ジホモマーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式



(式中、R¹は低級アルキル基を示し、R²は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R²が複数ある場合には、複数のR²は同一であっても異なってもよい。nは0~5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモマーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモマーリノレン酸の製造法。

(2) 請求項1記載の式(1)で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はジホモマーリノレン酸(Δ8, 11, 14エイコサトリエン酸)を発酵法により安価に大量生産する方法および微生物や動物細胞の脂肪酸に対するΔ5位不飽和化反応抑制剤に関する。(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

ジホモマーリノレン酸を生産する方法として、グルコースを主原料とする培地にゴマ油を添加してモルチエレラ属微生物を培養することにより、ジホモマーリノレン酸を含む脂質を生産する方法が知られている(R. Yamada, et al., J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 66, p237~241(1989))。

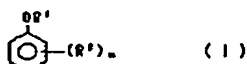
また、脂肪酸のΔ5位不飽和化反応抑制剤としては、ゴマ油中のセサミン、エビセサミンが知られている(R. Yamada, et al., 日本農薬学会誌63巻, p676(1989))。しかしながら、セサミンやエビセサミンを大量に採ることはコスト的に高く、実用性に劣るという欠点があった。

特開平3-72892(2)

(課題を解決するための手段)

そこで、本発明者はジホモエーリノレン酸の発酵法による大量生産について鋭意研究した結果、特定の化合物を培地に添加することにより目的を達成できること、並びに該化合物が脂肪酸のΔ5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はジホモエーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式



(式中、R¹は低級アルキル基を示し、R²は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R²が複数ある場合には、複数のR²は同一であっても異なってもよい。nは0～5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモエーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモエーリノレン酸の製造法および上記一般式で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸のΔ

5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はジホモエーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式

(式中、R¹は低級アルキル基を示し、R²は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R²が複数ある場合には、複数のR²は同一であっても異なってもよい。nは0～5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモエーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモエーリノレン酸の製造法および上記一般式で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸のΔ

5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

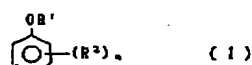
すなわち、本発明はジホモエーリノレン酸生産能を有する微生物を、一般式

(式中、R¹は低級アルキル基を示し、R²は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R²が複数ある場合には、複数のR²は同一であっても異なってもよい。nは0～5の整数を示す。)で表わされる化合物を添加した培地で培養し、培養物からジホモエーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモエーリノレン酸の製造法および上記一般式で表わされる化合物を主成分とする脂肪酸のΔ

5位不飽和化反応抑制剤を提供するものである。

本発明で使用する微生物は、ジホモエーリノレン酸生産能を有するものであればよく、例えばコニディオボラス属やモルティエラ属に属するジホモエーリノレン酸生産能を有する微生物を挙げることができる。具体的には、コニディオボラス・ナノデス(*Conidioobolus nanodes*)CBS 183/62、コニディオボラス・ランブラウジェス(*Conidioobolus lamprauges*)ATCC 12525、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)IFO 8568等が挙げられる。

本発明では、上記微生物を培養してジホモエーリノレン酸を製造するための培地に、一般式



(式中、R¹、R²およびnは前記と同じである。)で表わされる化合物を含むことが必須である。上記一般式中のR¹は低級アルキル基を示す。低級アルキル基としては炭素数1～6の低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基などが挙げられる。R²は水酸基、アルキル基、アル

上記一般式で表わされる化合物の添加量としては、培地1あたり0.01～10g、好ましくは0.1～2gであるが、微生物の生育障害が起きなければ多い程よい。添加方法は、エタノールやジクロロメタンなどの適当な溶媒に溶解して添加することもできるが、培地の炭素源として用いる油脂に混合して添加するのが好ましい。また、添加する時期は培養を始める前が好ましいが、培養途中から加えてもよい。

上記微生物を培養するための培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含むものが用いられる。炭素源としては、ブドウ糖、オリブ油、サフラワー油、γ-リノレン酸含有油などの炭水化物や油脂等が用いられる。ここでγ-リノレン酸含有油としては、月見草油；モルティエラ(*Mortierella*)属、ムコール(*Mucor*)属、カニンガメラ(*Cunninghamella*)属等に属する未状態から抽出された微生物油があげられる。また、窒素源としては酵母エキス、ペプトン、大豆粕などの有機窒素源が好ましく、無機塩類としてはリン酸カ

特開平3-72892(3)

リウム (KH_2PO_4)、鉄塩 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、マグネシウム塩 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、亜鉛塩 (ZnSO_4)などが用いられる。その他、必要に応じて微量元素や栄養源を添加することもできる。

上記微生物の培養は通常、液体培地にて競とう培養や過気攪拌培養などにより行なわれる。培養条件は培養温度 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20 \sim 30^\circ\text{C}$ 、培養日数は $1 \sim 20$ 日であり、コニディオボラス属に属する微生物を用いる場合は $3 \sim 7$ 日が好ましいが、これらの条件は用いる微生物の性質等を考慮してジホモ-γ-リノレン酸の生産量が高くなるように設定すればよい。

このようにして培養物中にジホモ-γ-リノレン酸が生産されるので、培養物からジホモ-γ-リノレン酸を採取する。ジホモ-γ-リノレン酸は培養物よりそのまま採取してもよいが、培養物には炭素源として加えた油脂等が含まれるため、培養物より菌体を分離し、この菌体からジホモ-γ-リノレン酸を採取するのが好ましい。ジホモ-γ-リノレン酸の採取は、溶媒抽出やクロマト

グラフィーなどの常法により行なわれる。

次に、本発明の脂肪酸の $\Delta 5$ 位不飽和化反応抑制剤について説明する。本発明でいう $\Delta 5$ 位不飽和化反応とは、例えばジホモ-γ-リノレン酸からアラキドン酸への変換反応を指す。

本発明の脂肪酸の $\Delta 5$ 位不飽和化反応抑制剤は、前記一般式で表わされる化合物を主成分とするものである。その使用にあたっては、微生物や動物細胞に脂肪酸を加えたものに前記一般式で表わされる化合物を $0.1 \sim 100 \text{ mg/g}$ 乾燥菌体、好ましくは $5 \sim 70 \text{ mg/g}$ 乾燥菌体添加すればよく、これにより微生物や動物細胞の脂肪酸に対する $\Delta 5$ 位不飽和化反応を抑制することができる。

【実施例】

次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

比較例 1

第1表に示した組成の培地に炭素源として 16% γ-リノレン酸含有油 (オレイン酸 40% 、リノール酸 10% 、γ-リノレン酸 16%) を 30

g/l 加えた培地を作製した。この培地 100 ml を 500 ml の三角フラスコに入れ、 121°C で 15 分間滅菌処理した。このフラスコにコニディオボラス・ナノデス C85 183/62 を接種し、 30°C で 4 日間競とう培養した。

第1表 培地組成

KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
ペプトン	10 g
イーストエキストラクト	5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
蒸留水	1 l

培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、リノ酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて洗浄した後、吸引ろ過により菌体を採取した。この菌体をアルミ製のカップに入れ、ガラスビーズ、メタノール、クロロホルムを加えてホモジナイザーで菌体を破砕し、菌体内の脂質を抽出した。抽出した脂質を BF_3 -メタノールを用いてメチルエステル化し

て、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べた結果を第2表に示す。

なお、ジホモ-γ-リノレン酸の同定は以下の方法により行なった。ジホモ-γ-リノレン酸の標品と本サンプルを混合してキャピラリーガスクロマトグラフィー (カラム: PEG 20M) で分析したところ、ジホモ-γ-リノレン酸画分のピークが大きくなった。また、本サンプルを硝酸銀含浸薄層クロマトグラフィーによりトリエン画分を分取した。この画分にはγ-リノレン酸とジホモ-γ-リノレン酸が含まれていた。分取したトリエン画分から液体クロマトグラフィー (カラム: ODS) によりジホモ-γ-リノレン酸を分取した。このジホモ-γ-リノレン酸をピコリニル誘導体化し、キャピラリーガスマススペクトラムにより同定した。その結果、 $\Delta 8$, 11 , 14 エイコサトリエン酸、すなわちジホモ-γ-リノレン酸であることが確認された。

実施例 1

比較例 1 と同様の培地を作成し、これに第2表

特開平3-72892(4)

第2表

	比較例 1	実施例1		
BHA量(g/ℓ)	0	0.3	0.7	1.0
菌体収量(g/ℓ)	22.0	24.4	21.0	17.4
油脂収量(g/ℓ)	6.8	7.7	6.5	6.0
脂肪酸組成(X)				
ミリスチン酸(C _{14:0})	1.1	—	1.8	—
パルミチン酸(C _{16:0})	24.1	—	26.1	—
ステアリン酸(C _{18:0})	4.1	—	4.6	—
オレイン酸(C _{18:1})	27.0	—	30.0	—
リノレン酸(C _{18:3})	6.1	—	6.7	—
γ-リノレン酸(C _{18:3})	6.3	—	6.3	—
エイコサノ酸(C _{20:1})	3.0	—	1.9	—
20:2-γ-リノレン酸(C _{20:2})	4.1	8.6	13.3	11.5
アラキドン酸(C _{22:6})	15.7	9.7	3.2	1.7
ドコサノ酸(C _{22:0})	3.2	—	2.7	—
その他	5.3	—	3.4	—
20:2-γ-リノレン酸 収量(g/ℓ)	—	0.66	0.85	0.69

に示した所定量のtert-ブチルヒドロキシアニソール(BHA)を添加した。添加方法は、所定量のBHAをエタノールに溶解したものを500mlフラスコに入れ、さらに15%γ-リノレン酸含有油3gを加え、窒素気流下でエタノールをとばしてBHAを油に混合した後、ここに第1表に示した培地を100ml加えて培地を作成した。この培地を滅菌後、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第2表に示す。

第2表より明らかなように、BHAの添加によってジホモγ-リノレン酸の含有率が顕著に上昇し、アラキドン酸の含有率が相対的に低下しており、Δ5位不飽和化反応が特異的に顕著されていることがわかった。

実施例2

実施例1において、第3表に示した所定量の化合物を用いたことおよび所定の培養日数にしたこと以外は実施例1と同様の操作を行なった。この結果を第3表に示す。

特開平3-72892 (5)

表 3 変

化合物(g/l)	培養日数 (日)	固体収量 (g/l)	リノール酸含有率(%)	アラキドン酸含有率(%)	リノール酸含有率(%)
7-ノル	0.5	3	25.7	7.9	10.9
	1.0	5	19.9	10.2	11.4
6-ノル	0.5	4	20.4	10.9	7.8
9-ノル	0.5	3	17.0	8.0	9.7
	1.0	4	20.3	9.5	4.6
14-ノル	0.5	3	20.3	10.4	4.7
BHA	0.5	4	22.3	11.1	3.9
	1.0	5	17.4	11.5	3.0
3-(4-ヒドロキシフェニル)- プロパン	1.0	4	27.9	8.9	6.5
4-ヒドロキシベンズ	0.5	3	27.7	11.3	4.8
	1.0	3	28.7	12.0	4.9
9-ノル	0.5	3	28.5	9.1	7.9
	1.0	3	25.3	7.8	5.4
1,2,3-トリヒドロキシ	0.5	5	24.4	6.9	12.0
	1.0	7	21.3	8.5	13.4
1,2,4-トリヒドロキシ	0.5	3	22.4	7.8	6.4
	1.0	4	13.8	14.0	15.0
1,2,5-トリヒドロキシ	0.5	3	27.0	7.2	6.2
	1.0	3	22.3	6.8	11.3
9-ノル	0.5	4	34.8	10.8	11.6
	1.0	4	40.8	10.0	7.8

実施例 3

第1表に示した培地の8倍濃度の培地に1.6%
リノール酸含有油を9.0g/lに加え、さらに
BHAを実施例1と同様の方法により2.1g/l
加えた培地を作成した。この培地を10lリ
ャーファマンターに入れ、12lで15分間減
速した。次いで、コニディオボラス・ナノデス CBS
183/62を第1表に示した培地に1.6%リノール
酸含有油3.0g/lを加えた培地600mlで培
地培養したものを、上記リャーファマンターに全量
接種し、30℃で7日間通気攪拌培養した。培養
終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂
肪酸組成を分析した。その結果、アラキドン酸含
有率は1.0%、リノール酸含有率は1.5%、
リノール酸含有率は培地1l
あたり3.3gであった。

実施例 4

実施例2において、添加したBHA量を1g/
lとしたこと、培養日数を4日としたことおよび接
種した微生物をコニディオボラス・ランブラウジ
エス ATCC 12585 としたこと以外は実施例2と同
様の操作を行なった。その結果、固体収量は18.7

g/l、油脂収量は5.9g/l、リノール酸含有率は9.3%、
リノール酸含有率は0.54g/l、アラキドン酸含有
率は9.0%であった。

実施例 5 および比較例 2

第1表に示した培地に1.6%リノール酸含
有油3.0g/l添加した培地(比較例2)、第1
表に示した培地に1.6%リノール酸含有油3.0
g/lおよびBHA 0.5g/l添加した培地(実
施例5)を作成し、これらの培地にモルチエ
ラ・アルピナ 3FO 8568 を接種し、20℃で第4
表に示した所定日数培地を培養した。培養終了後、
比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成
を分析した。この結果を第4表に示す。

表 4 変

	培養日数 (日)	固体収量 (g/l)	リノール酸含有率(%)	アラキドン酸含有率(%)
実施例 5	20	15.4	1.3	0.8
比較例 2	15	18.7	0.4	1.1

特開平3-72892 (6)

最も明らかなように、モルチエラ菌微生物を用いた場合においてもアラキドン酸よりもジホモγーリノレン酸含有率の高い油脂を得ることができた。

(発明の効果)

本発明によれば、微生物菌体内のアラキドン酸含有率を下げ、ジホモγーリノレン酸含有率を上げることができるので、ジホモγーリノレン酸を効率よく安価に大量生産できる。また、本発明によれば脂肪酸のΔ5位不飽和化反応を低コストに抑制することができる。得られたジホモγーリノレン酸は医薬、生化学用試薬として有用である。

特許出願人 出光石油化学株式会社

代理人 弁理士 久保田 嘉 郎

